

· 诊断制剂 ·

基于免疫组库测序筛选发热伴血小板减少综合征病毒刺突蛋白单克隆抗体

郑文君^{1△}, 张思伊^{2△}, 侯瑶¹, 高艳洁¹, 陈艳莉², 朱庆祥², 王梁¹,
聂凯晓¹, 于立娟¹, 姬敬开², 张振杰¹, 全传松^{1,3}

1. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)临床与基础医学院(基础医学研究所)病原生物学系,
山东 济南 250014; 2. 山东第一医科大学(山东省医学科学院)生命科学学院生物信息系,
山东 泰安 271016; 3. 山东第一医科大学第二附属医院感染科, 山东 泰安 271000

摘要: **目的** 基于免疫组库测序筛选发热伴血小板减少综合征病毒(severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, SFTSV)糖蛋白 Gn 单克隆抗体,并鉴定其生物学特性。**方法** 以纯化的 SFTSV-Gn 作为诱饵,从免疫的雌性 BALB / c 小鼠 B 细胞库中钓取病毒特异性 B 细胞,利用 10 × 免疫组库测序方法,结合生物信息学分析,挑选具有潜在结合活性的抗体序列,构建至真核表达载体 pcDNA3.4,进行单克隆抗体的表达及纯化,并鉴定其生物学活性。**结果** 从捕获的 3 544 个 B 细胞中挑选出 14 株抗体,功能验证显示 12 株抗体能结合 SFTSV-Gn 糖蛋白,而其中 C9 和 9 / 10 抗体结合力较高;Western blot、间接免疫荧光试验(immunofluorescence assay, IFA)和流式细胞术证明该抗体能够特异性识别 SFTSV,有效浓度低至 2 μg / mL。**结论** 成功获得了针对 SFTSV-Gn 糖蛋白的单克隆抗体,为 SFTSV 快速诊断试剂的开发奠定了基础。

关键词: 发热伴血小板减少综合征病毒;特异 B 细胞;单克隆抗体;Gn 糖蛋白

中图分类号: R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5503(2025)01-0014-08

DOI:10.13200/j.cnki.cjb.004400

Identification of monoclonal antibodies against spike protein of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus based on immune repertoire sequencing

ZHENG Wenjun*, ZHANG Siyi, HOU Yao, GAO Yanjie, CHEN Yanli, ZHU Qingxiang, WANG Liang,
NIE Kaixiao, YU Lijuan, JI Jingkai, ZHANG Zhenjie, QUAN Chuansong

*Department of Pathogen Biology, School of Clinical and Basic Medical Sciences, Shandong
First Medical University & Shandong Academy of Medical Sciences,
Jinan 250014, Shandong Province, China

Corresponding author: QUAN Chuansong, E-mail: emergy_2008@126.com

Abstract: **Objective** To obtain monoclonal antibodies against the glycoprotein Gn of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV) based on immune repertoire sequencing and identify the biological characteristics. **Methods** Using purified SFTSV-Gn as bait, virus-specific B cells were captured from B cell library of immunized female BALB/c mice. Based on 10 × immune repertoire sequencing and bioinformatics analysis, the antibody sequences with potential binding activity were selected and constructed into eukaryotic expression vector pcDNA3.4. The monoclonal antibodies were expressed and purified, and identified for the biological activity. **Results** Fourteen antibodies were selected from 3 544 captured B cells, and the functional verification showed that 12 antibodies could bind to SFTSV-Gn glycoprotein, among which C9 and 9/10 antibodies had higher binding ability. Western blot, indirect immunofluorescence assay (IFA) and flow cytometry proved that they specifically recognized SFTSV, and the effective concentration was as low as 2 μg/mL. **Conclusion** The monoclonal antibodies against SFTSV-Gn glycoprotein were successfully obtained, which lays a foundation for the development of rapid

基金项目: 山东省自然科学基金青年项目(ZR2020QH133).

通信作者: 全传松, E-mail: emergy_2008@126.com

△: 共享第一作者

diagnostic reagents for SFTSV.

Keywords: Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus (SFTSV); Virus-specific B cells; Monoclonal antibodies; Gn glycoprotein

发热伴血小板减少综合征(severe fever with thrombocytopenia syndrome, SFTS)是一种新发蜱媒传染病, 2009 年首次在中国河南省等地区被发现^[1-2], 其病原体是发热伴血小板减少综合征病毒(severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, SFTSV)。SFTSV 属于布尼亚病毒目(*Bunyavirales*), 白纤病毒科(*Picornaviridae*), 班达病毒属(*Bandavirus*), 大别班达病毒(*Dabiebandavirus*)^[3]。

SFTS 以临床出现高热、胃肠道不适、血小板减少、白细胞降低等症状为特征^[4-5]。该病起病急骤, 部分患者从出现症状到昏迷或死亡, 平均仅需 9 d, 若治疗过程中合并真菌感染, 则可显著增加疾病严重程度^[6]。据文献报道, 2010—2018 年, 中国共确诊 7 721 例 SFTS, 不同流行地区之间死亡率存在差异, 平均死亡率为 10.5%^[7]。自发现以来, 报道 SFTSV 感染的地域不断扩大, 目前中国已有 25 省份报道^[8-9], 2012 年后, 日本、韩国、美国、越南和中国台湾也不断有 SFTS 报道^[10-15]。SFTSV 感染宿主谱亦不断扩大, 可感染常见宠物, 现已从犬、猫等分离获得^[16-17], 日本还在动物园圈养的猎豹分离获得^[18]。因此, SFTS 危害日益严重。

SFTSV 基因组包括 3 个基因片段: 大片段(*L*)、中片段(*M*)和小片段(*S*)^[19]。其中 *M* 基因编码病毒糖蛋白前体, 被酶切成 N 端的糖蛋白(Gn)和 C 端的糖蛋白(Gc), 可诱导产生中和抗体^[8, 20], 在抗 SFTS 感染过程中发挥重要作用。本研究以纯化的 SFTSV-Gn 糖蛋白为诱饵^[21], 制备 SFTSV 免疫的小鼠脾脏淋巴细胞, 分选病毒特异性 B 细胞^[22], 进行单细胞高通量测序, 获得转录组和免疫组库, 挑选具有潜在活性的抗体进行克隆、表达及纯化, 验证生物学活性, 获得具有结合活性的抗体, 为临床 SFTS 快速诊断技术的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、病毒、质粒及菌株 人胚胎肾细胞 HEK293T 和 HEK293F、人单核细胞白血病(THP-1)细胞、Vero 细胞、SFTSV 毒株(SDTA-1, GenBank: KX641909)均由山东省高等学校新发传染病病因流行病学重点实验室保存; 表达载体 pcDNA3.4 购自南京金斯瑞生物科技有限公司; 大肠埃希菌 DH5 α 购自日本 TaKaRa 公司。

1.2 实验动物 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠, 12 只, 6~8 周龄, 体质量 16~24 g, 购自济南朋悦实验动物有限责任公司, 动物许可证号: SCXK(鲁)20220006。本实验均以科研为目的进行动物的养殖和使用, 且按照实验动物伦理相关规定进行(W2023083000294)。

1.3 主要试剂及仪器 DMEM 培养基(货号: C1199-5500BT)、胎牛血清(FBS, 货号: 10437-028)购自美国 Gibco 公司; 青链霉素双抗(货号: P1400)、DMSO(货号: D8371)、红细胞裂解液(货号: R1010)、10 $\times$ PBS(货号: G4207)、FITC 标记的羊抗鼠 IgG(货号: SF131)购自北京索莱宝科技有限公司; 聚乙烯亚胺(PEI, 货号: 043896)购自美国 Polysciences 公司; HRP 标记的羊抗鼠 IgG(货号: DP110087)购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Alexa Fluor[®] 700(货号: 564997)购自美国 BD 公司; 鼠抗 CD3-FITC、CD16-FITC、CD45-PE、IgG-PecpCY5.5 及抗 His tag 标签蛋白-APC 标记的单克隆抗体购自 Biolegend(北京)生物科技有限公司; QuickAntibody(货号: KX0210042)免疫佐剂购自北京博奥龙免疫技术有限公司; 反转录试剂(货号: FSQ101)购自东洋纺(上海)生物科技有限公司; 无内毒素质粒提取试剂盒(货号: DP118-02)购自天根生化科技(北京)有限公司; His 亲和层析柱(货号: 29048586)购自美国 Cytiva 公司; Protein A 亲和层析柱(货号: L00680)购自南京金斯瑞生物科技有限公司; FACS Aria III 流式细胞仪购自美国 BD 公司; 酶标仪购自美国 BioTek 公司; Agilent 2100 Bioanalyzer 购自美国 Agilent 公司。

1.4 小鼠免疫及脾脏单细胞制备 将 SFTSV(约 10⁵ TCID₅₀)与佐剂按体积分数 1:1 混合^[23], 经 BALB/c 小鼠后肢小腿肌内进行免疫, 100 μ L/只, 间隔 14 d 进行二次免疫; 3 d 后经小鼠尾端采血分离血清, 检测中和效价^[24]。免疫合格小鼠经颈椎脱臼处死, 酒精浸泡 5 min; 取脾脏浸泡在无血清 RPMI1640 培养基中, 研磨并经筛网涮洗过滤, 400 $\times$ g 离心 5 min; 收集细胞, 加入红细胞裂解液, 冰上裂解 15 min; 分别用 PBS 和 RPMI1640 培养基 400 $\times$ g 离心 5 min; 洗涤细胞 2 次, 加入冻存液(FBS + 10% DMSO)冻存细胞, 备用。

1.5 SFTSV 特异性 B 细胞的流式分选 按照文献^[25]进行 SFTSV-Gn 表达, 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成质粒 pcDNA3.4-SFTSV-Gn, 转化感受态大肠

埃希菌 DH5 α , 按照质粒提取试剂盒说明书提取目的质粒, 并送北京擎科生物科技股份有限公司测序。用 PEI 将质粒转染至人胚胎肾细胞 HEK293T, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 细胞培养箱培养 72 h; 收集上清, 用 His 亲和层析柱纯化重组 SFTSV-Gn 蛋白, 经 10% SDS-PAGE 鉴定后, 置 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

取冻存小鼠脾细胞, 经 2% FBS 洗涤 2 次, 加入 SFTSV-Gn 蛋白冰上孵育 30 min; 按试剂说明书将鼠抗 CD3-FITC、CD16-FITC、CD45-PE、IgG-PecpCY5.5 与抗 His tag 标签蛋白-APC 按体积分数 1 : 1 混匀后, 加至细胞悬液中, 避光染色 30 min; 洗涤 2 次, 加入 100 μL 含 Alexa Fluor[®] 700 (工作浓度: 66.7 ng / mL) 细胞活性染料的 PBS 重悬细胞, 避光冰上孵育 10 ~ 15 min; 重悬后分选出活 SFTSV-Gn⁺CD45⁺CD3⁻CD16⁻B 淋巴细胞^[26-28]。

1.6 单细胞测序 将上述流式分选细胞液浓缩至上样体积, 由北京果壳生物科技有限公司完成文库构建和数据分析, 具体利用 10 $\times$ Single Cell 5' Reagent Kit v3.1 完成转录组和 B 淋巴细胞抗原受体组库 (B-cell receptor, BCR) 的构建, 经 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测合格后, 利用 Illumina Novaseq 6000 平台完成测序, 每个样本获得 80 Gb 的测序转录组和 20 Gb BCR 免疫组库数据。对产生的数据运用软件 FastQC 质检、软件 Cell Ranger 分析后, 获得抗体成对的重链和轻链序列。

1.7 抗 SFTSV-Gn 单克隆抗体质粒的挑选及构建 根据文献报道的抗体挑选原则^[26-27], 挑取克隆型丰富或唯一分子标记 (Unique Molecular Identifier, UMI) 序列数高的 14 个抗体序列进行基因合成。挑选出的抗体可变区基因由南京金斯瑞生物科技有限公司合成后, 连接至装有鼠源单克隆抗体重链和轻链恒定区基因的 pcDNA3.4 载体中, 按照抗体挑选序列顺序和方式, 将抗体命名为 C1、C3、C5、C7、C9、5 / 6、9 / 10、13 / 14、19 / 20、23 / 24、27 / 28、35 / 36、39 / 40 和 41 / 42, 共 14 个抗体。

1.8 抗体纯化及鉴定 将合成的抗体序列质粒按重链 : 轻链 = 1 : 2 的质量比转染至 HEK293T 或 HEK-293F 细胞 72 h 后, 收集细胞上清, 浓缩 10 倍后进行 10% SDS-PAGE 分析; 将分离的蛋白转移至 PVDF, 用 5% 脱脂奶 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜; 加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1 : 2 000 稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h; PBST 洗涤 5 次, ECL 法曝光显影。利用 Protein A 亲和层析柱纯化^[29] 鉴定正确的目的抗体, 用于后续功能试验。

1.9 抗体活性鉴定

1.9.1 抗体结合力试验 采用 ELISA 法。分别用 Gn

蛋白 (200 ng / 孔) 和 SFTSV (约 10^4TCID_{50}) 包被 ELISA 板, 加入样品后 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 经 5% 脱脂乳 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h; PBST 洗涤, 将纯化的抗体按 50 μg / mL 加至板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min; PBST 洗涤, 加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1 : 2 000 稀释), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min; PBST 洗涤, 加入 60 μL TMB 显色液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱静置 10 min; 加入 60 μL 终止液, BioTek 酶标仪检测 A_{450} 。试验重复 2 次, 每次设复孔, 最后以均值表示。

1.9.2 抗原性 将接种 SFTSV 的 Vero 细胞转印至 PVDF 膜上, 加入封闭液 (5% 脱脂乳), 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 用纯化的抗体 (50 μg / mL) 作为一抗, HRP 标记的山羊抗鼠 IgG (1 : 2 000 稀释) 作为二抗, 对目的条带进行质谱鉴定, 具体操作步骤同 1.8 项。

1.9.3 特异性 采用间接免疫荧光试验 (immunofluorescence assay, IFA)。将 Vero 细胞以 1.5×10^4 个 / 孔铺至 96 孔板, 次日按照 MOI = 0.1 接种 SFTSV, 更换为 1% 维持液后, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 细胞培养箱培养 96 h; 加入预冷无水乙醇, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 30 min; 晾干, 用 3% BSA 稀释待测抗体至 10、2、0.4 μg / mL, 加至固定孔中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min; PBST 洗涤, 加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG (1 : 150 稀释), 避光孵育 30 min; PBST 洗涤 3 次, 加入 60 μL DAPI 染色, 避光孵育 5 min; PBST 洗涤 3 次, 加入 50 μL 20% 甘油, 荧光显微镜下避光观察。

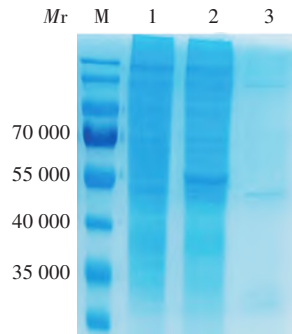
1.10 感染 SFTSV 细胞的检测 利用制备的抗体分析 SFTSV 感染的 THP-1 细胞: 将 THP-1 细胞按 0.1 和 1 MOI 感染 THP-1 细胞后, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 细胞培养箱培养 96 h; 预冷无水乙醇固定细胞, 加入单克隆抗体 (50 μg / mL), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min; 加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG (1 : 100 稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min; 上 BD FACS Aria III 流式细胞仪检测细胞, 经 FlowJo-V10 软件分析结果。

1.11 统计学分析 正态分布定量资料的两组比较采用独立样本 t 检验或使用 *One-way ANOVA test* 进行多组间比较, 偏态分布定量资料的组间比较采用 *Mann-Whitney U* 秩和检验, 以 $P < 0.05$ (双侧检验) 为检验水准, 多重比较时采用错误发现率 (false discovery rate, FDR) 方法进行多重检验的校正。使用软件 Graphpad Prism 8.0 进行统计分析作图。

2 结果

2.1 SFTSV 特异 B 细胞分选及测序 BALB / c 小鼠经二次免疫后, IFA 检测中和效价达 1 : 640, 无菌分离小鼠脾脏淋巴细胞冻存备用。纯化的 SFTSV-Gn 蛋白经 10% SDS-PAGE 分析, 可见相对分子质量约

55 000 的目的蛋白条带,见图 1。从复苏小鼠脾脏淋巴细胞中分选特异性 B 细胞,分选策略见图 2,即圈出 CD45 阳性的单个淋巴活细胞后,排除 CD3、CD14 和 CD16 代表的 T 细胞和单核细胞,分选 SFTSV-Gn⁺ 的单核淋巴淋巴细胞。



M:蛋白质 marker;1~3:分别为2%、10%、30%咪唑洗脱。

图 1 纯化 SFTSV-Gn 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of purified SFTSV-Gn protein

2.2 单细胞数据及抗 SFTSV-Gn 单克隆抗体质粒的鉴定 单细胞转录组和 BCR 测序下机数据经比对、拼接和组装后,共获得 3 544 个 B 细胞,平均每个细胞中的 reads 数为 10 882 个,其中具有完整抗体轻重链的为 3 289 个,根据克隆型丰度或 UMI 序列数,挑选靠前的 14 个抗体进行基因合成及质粒构建。抗

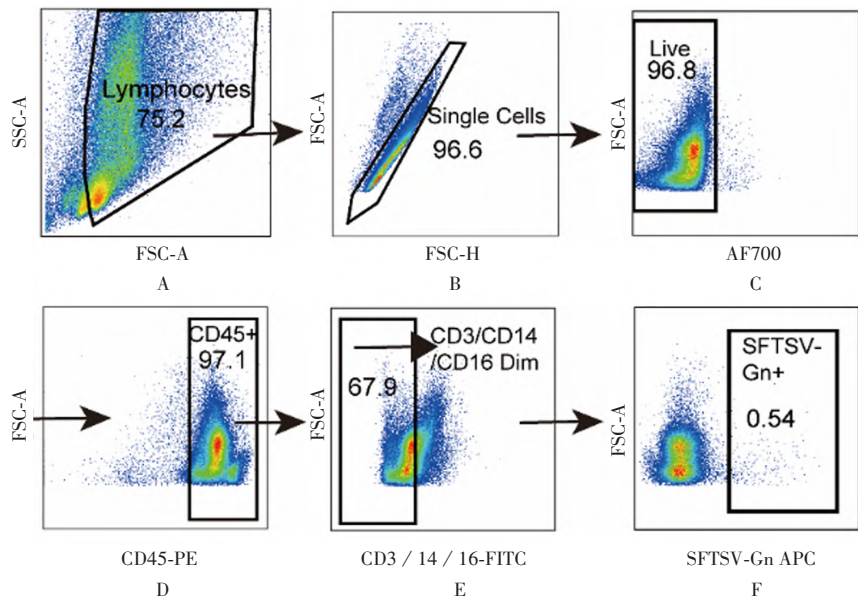
体质粒经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,可见约 7 000 bp 的特异性条带,且以超螺旋构象为主,大小与预期相符,见图 3;测序结果经序列比对,显示目的基因片段与挑选的抗体基因序列一致。表明质粒构建成功。

2.3 表达的抗体的鉴定 鉴定正确的抗体基因转染至 HEK293T 细胞 72 h 后,细胞上清经 10% SDS-PAGE 及 Western blot 鉴定,均在相对分子质量约 55 000 处,可见目的蛋白条带,表明目标抗体成功表达,见图 4;经 Protein A 亲和层析后,可见单一对称峰,表明抗体纯度可满足后续试验需求,见图 5。

2.4 抗体活性鉴定

2.4.1 结合力 挑选的 14 株 SFTSV-Gn 特异性抗体经 ELISA 检测,3 株为阳性($A_{450} > 0.2$),12 株对 Gn 有结合力,其中 C9 和 9 / 10 对 Gn 的结合力(A_{450})分别为 3.65 和 2.3,对 SFTSV 的 A_{450} 为 0.3 和 0.23,见表 1。因此,后续选择 C9 和 9 / 10 进行进一步研究。

2.4.2 抗原性 Western blot 分析显示,抗 SFTSV-Gn 单克隆抗体可与纯化的重组 Gn 蛋白和 SFTSV 发生特异性反应,前者在相对分子质量约 55 000 处可见特异性条带,大小与预期相符,见图 6A 和图 6B,而 SFTSV 在相对分子质量约 60 000、50 000 和 35 000 处可见 3 条主带,见图 6C 和图 6D。进一步对相对分子质量约 35 000 处的主带切胶后质谱鉴定发现,抗体识别区段为 31 ~ 272 位。见图 7。



A:以 FSC 和 SSC 圈出淋巴细胞亚群图;B:以 FSC-H 圈出单个淋巴细胞亚群图;C:以 AF700 圈出活淋巴细胞亚群图;D:以 CD45 圈出淋巴细胞亚群图;E:去除 CD3 / 14 / 16 淋巴细胞亚群图;F:圈出 SFTSV-Gn 阳性淋巴细胞亚群图。

图 2 特异 B 细胞流式圈门策略

Fig. 2 Flow cytometry gating strategy for specific B cells

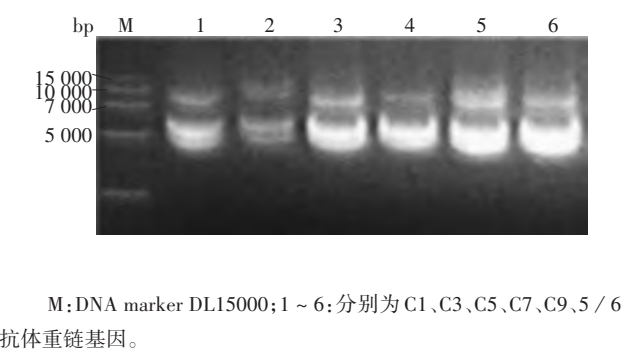
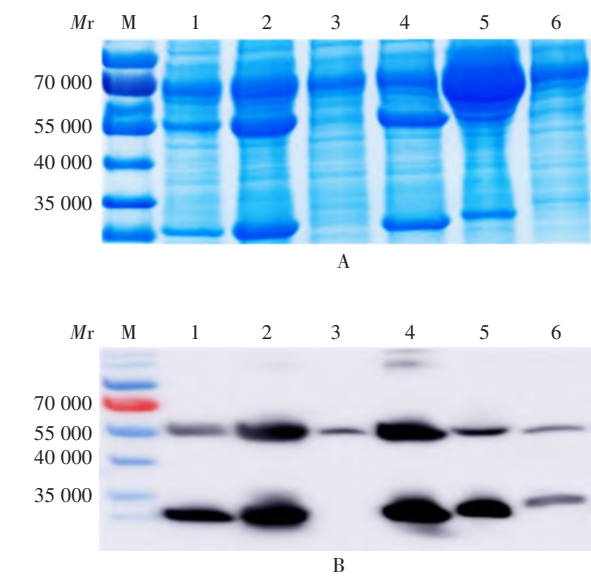


图 3 部分抗体基因重链鉴定电泳图

Fig. 3 Electrophoretic profile of partial antibody gene heavy chain identification



M: 蛋白质 marker; 1 ~ 6: 分别为 C1、C3、C5、C7、C9、5 / 6 抗体。

图 4 部分抗体蛋白的 SDS-PAGE (A) 及 Western blot (B) 鉴定

Fig. 4 Identification of partial antibody proteins by SDS - PAGE (A) and Western blot (B)

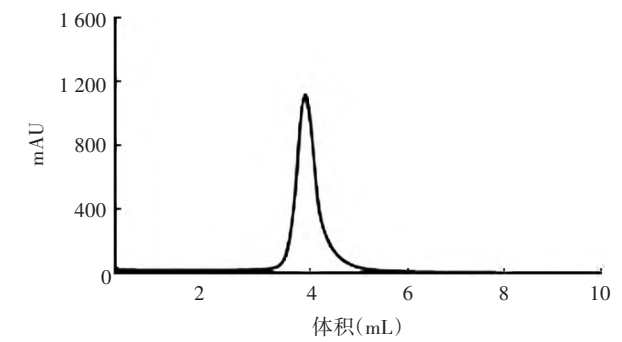


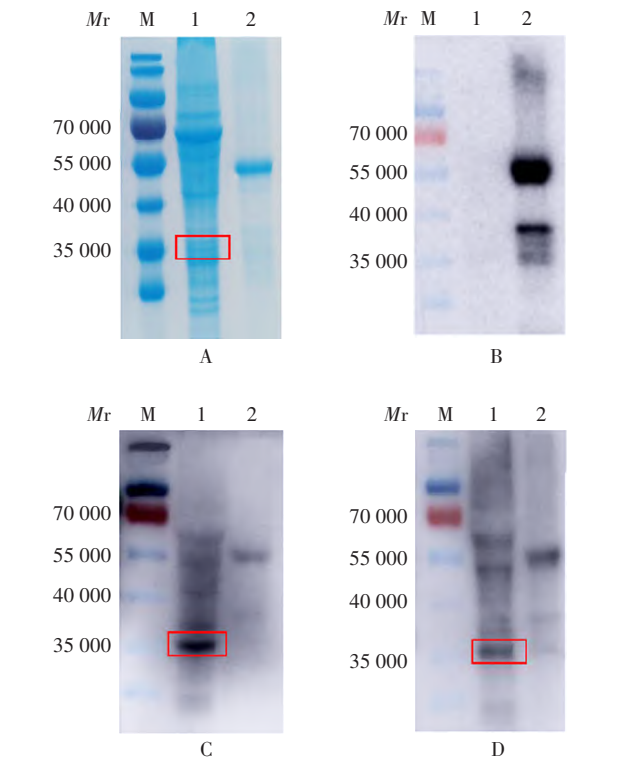
图 5 抗体的 Protein A 亲和层析纯化图谱

Fig. 5 Protein A affinity chromatography purification map of antibodies

表 1 挑选的抗体对 SFTSV 和 Gn 蛋白的结合力 (A_{450})

Tab. 1 Binding ability of selected antibodies to SFTSV and Gn protein (A_{450})

抗体	SFTSV	Gn
C1	0. 53	0. 48
C3	0. 23	2. 30
C5	0. 17	0. 65
C7	0. 18	0. 85
C9	0. 23	2. 30
5 / 6	0. 14	1. 80
9 / 10	0. 30	3. 65
13 / 14	0. 15	0. 85
19 / 20	0. 09	0. 12
23 / 24	0. 08	0. 13
27 / 28	0. 13	0. 46
35 / 36	0. 15	2. 40
39 / 40	0. 11	0. 35
41 / 42	0. 15	0. 32



A: SFTSV 和 Gn 蛋白的 SDS-PAGE 鉴定; B: 带有 His 标签的 Gn 蛋白的 Western blot 鉴定; C: 9 / 10 抗体活性的 Western blot 鉴定; D: C9 抗体活性的 Western blot 鉴定; M: 蛋白质 marker; 1: SFTSV; 2: 含有 His 标签的 Gn 蛋白。

注: 图中红色方框代表切胶质谱鉴定位置。

图 6 2 株抗体识别 SFTSV 活性位点的鉴定

Fig. 6 Identification of SFTSV active sites recognized by two antibodies

1 MMKVIWFSSL ICLVIQCSGD SGPIICAGPI HSNKSAGIPH LLGYSEKICQ
51 IDRLLIHVSSW LRNIISQIQGY VGQRGGRSQV SYPPAENSYS RWSGLLGPCD
101 ADWTGMTLVVK KARESDMIVP GPSYKGKVFV ERPTFDGYVG WGCSSGKSR
151 ESGELCSSDS GTSSGLLPSPD RVLWTIGDVAC QIMTPTPEET FLRLKSFSQS
201 EFPDICKTDG TVFNQCRGES LPQPFDAVWM DVGHISIKITM RENHTKWVQE
251 SSSKDFVCYK EGTGPCSESE EKACKTSGSC RCDMQECKVA GCEHGEETSE

注:图中红色字体代表质谱鉴定出的 Gn 肽序列。

图 7 抗体的质谱检测

Fig. 7 Mass spectrometry for antibodies

2.4.3 特异性 IFA 结果显示,9 / 10 和 C9 抗体均可与接种 SFTSV 的 Vero 细胞特异性结合,产生荧光反应,而未感染 SFTSV 的 Vero 细胞对照未见荧光,表明制备的单抗可特异性识别 SFTSV-Gn 蛋白;同时,9 / 10 和 C9 抗体在 2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 浓度下仍能产生荧光反

应,但在 0.4 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 浓度下未见荧光,可见 2 株抗体最低有效浓度约为 2 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 。见图 8。

2.5 细胞的病毒感染率 对不同 SFTSV 感染剂量的 THP-1 细胞,用 C9 抗体检测发现,未感染 THP-1 细胞,可检测到约 0.02% 的阳性细胞,而感染 SFTSV 的 THP-1 细胞出现典型强阳性细胞集落,见图 9;0.1 MOI 的感染率为 0.7%,1 MOI 的感染率为 4.1%,多组间比较差异有统计学意义($F = 12.4, P < 0.05$),其中 1 MOI 的感染率显著高于未感染细胞($t = 31.3, P = 0.003$),也显著高于 0.1 MOI($t = 22.9, P = 0.01$),但 0.1 MOI 的感染率与未感染细胞相比差异无统计学意义($t = 32.8, P = 0.002$),见图 10。表明 SFTSV 感染率与感染剂量呈正相关。

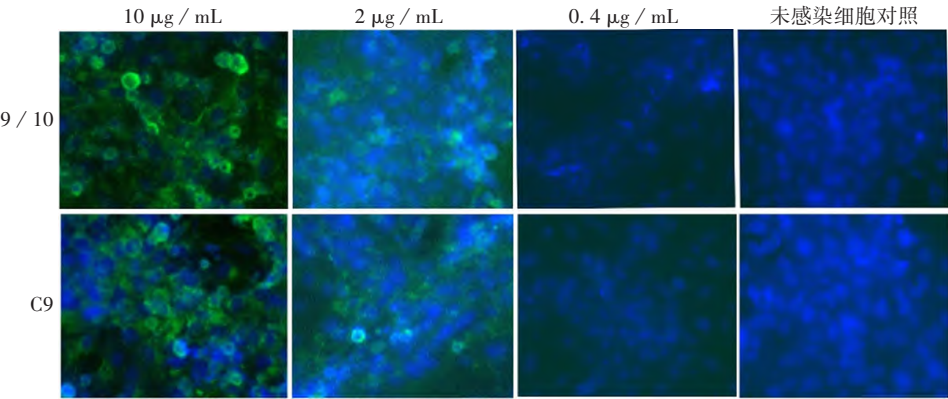
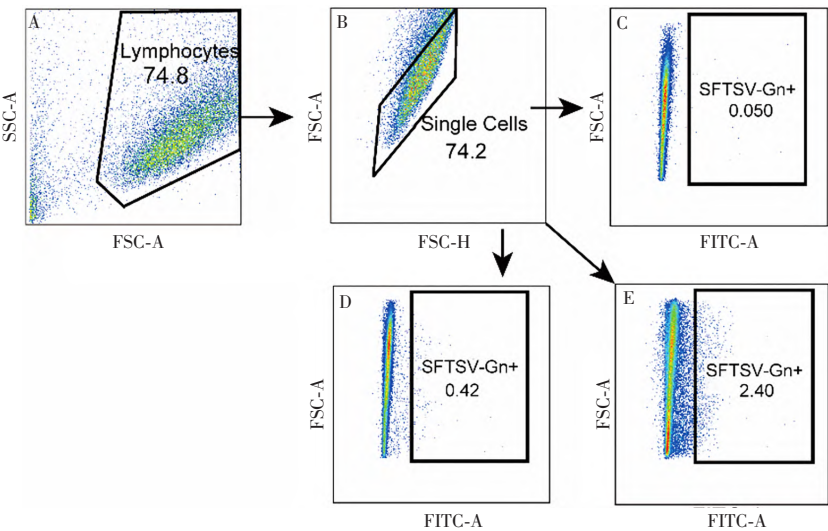


图 8 9 / 10 和 C9 抗体活性的 IFA ($\times 200$)

Fig. 8 IFA detection for 9 / 10 and C9 antibody immunoreactivity ($\times 200$)



A: 以 FSC 和 SSC 圈出淋巴细胞亚群图; B: 以 FSC-H 圈出单个淋巴细胞亚群图; C ~ E: 未感染以及 0.1 和 1 MOI SFTSV 感染 THP-1 细胞流式圈门图。

图 9 THP-1 细胞感染 SFTSV 的流式细胞术检测

Fig. 9 Flow cytometry detection of THP-1 cells infected with SFTSV

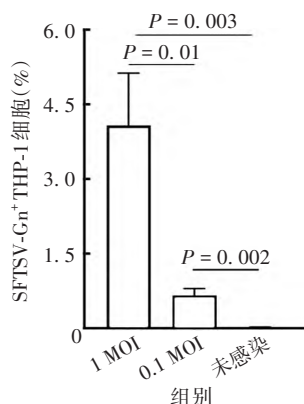


图 10 不同感染剂量的阳性 THP-1 细胞比例

Fig. 10 Proportion of positive THP-1 cells with different infection doses

3 讨论

目前临床上尚无特异的有效抗 SFTS 药物及快速诊断试剂,因此,开发简单、快速和敏感的检测试剂,以及有效中和性抗体药物对 SFTS 的防控具有重要意义。本研究通过流式分选筛选病毒特异性 B 细胞,经单细胞免疫组库测序获得潜在 SFTSV-Gn 蛋白单克隆抗体,最终获得 2 株抗体(C9 和 9/10)与 SFTSV-Gn 均具有较高的结合力,且 IFA、Western blot 和流式细胞术均证明其具有良好识别 SFTSV 的能力,为 SFTSV 抗原检测试剂的开发奠定了基础。

抗体是治疗和预防新发或已知病毒感染的有效药物^[30]。在新型冠状病毒和裂谷热病毒的治疗中,可显著减少患者住院时间及缓解病情,临床效果较好^[31-32]。而本研究未获得理想的中和抗体,除上述原因,可能是由于仅用 Gn 蛋白钓取病毒特异性 B 细胞,而忽略表达 Gc 蛋白的作用。尽管有文献报道利用 Gn 蛋白获得中和活性抗体^[33],但建议可用 Gn 与 Gc 的复合物从康复患者体内筛选中和抗体,且同一种属的汉坦病毒多采用这一分选策略^[34-35]。

参考文献

- [1] YU X J, LIANG M F, ZHANG S Y, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China [J]. *N Engl J Med*, 2011, 364 (16): 1523-1532.
- [2] LI J C, DING H, WANG G, et al. Dynamics of neutralizing antibodies against severe fever with thrombocytopenia syndrome virus [J]. *Int J Infect Dis*, 2023, 134: 95-98.
- [3] WANG P, LIU L, LIU A, et al. Structure of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus L protein elucidates the mechanisms of viral transcription initiation [J]. *Nat Microbiol*, 2021, 6 (5): 697-698.
- [4] LIU Q, HE B, HUANG S Y, et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome, an emerging tick-borne zoonosis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2014, 14 (8): 763-772.
- [5] SEO J W, KIM D, YUN N, et al. Clinical update of severe fever with thrombocytopenia syndrome [J]. *Viruses-Basel*, 2021, 13 (7): 1213-1229.
- [6] BAE S, HWANG H J, KIM M Y, et al. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with severe fever with thrombocytopenia syndrome [J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 70 (7): 1491-1494.
- [7] MIAO D, LIU M J, WANG Y X, et al. Epidemiology and ecology of severe fever with thrombocytopenia syndrome in China, 2010-2018 [J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 73 (11): e3851-e3858. DOI: 10.1093/cid/ciaa1561.
- [8] LI J C, WANG Y N, ZHAO J, et al. A review on the epidemiology of severe fever with thrombocytopenia syndrome [J]. *Chin J Epidemiol*, 2021, 42 (12): 2226-2233. (in Chinese)
- [9] 李佳宸, 王玉娜, 赵静, 等. 发热伴血小板减少综合征流行病学研究进展 [J]. *中华流行病学杂志*, 2021, 42 (12): 2226-2233.
- [10] YANG J Y, JIAO Y J, GUO X L, et al. Screening and identification of severe fever with thrombocytopenia syndrome Bunyavirus vaccine candidate strain [J]. *Chin J Biologicals*, 2014, 27 (10): 1243-1247+1252. (in Chinese)
- [11] 杨骏宇, 焦永军, 郭喜玲, 等. 发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒疫苗候选株的筛选及鉴定 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2014, 27 (10): 1243-1247+1252.
- [12] WANG T, XU L, ZHU B, et al. Immune escape mechanisms of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 937684. DOI: 10.3389/fimmu.2022.937684.
- [13] TAKAHASHI T, MAEDA K, SUZUKI T, et al. The first identification and retrospective study of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Japan [J]. *J Infect Dis*, 2014, 209 (6): 816-827.
- [14] KIM K H, KO M K, KIM N, et al. Seroprevalence of severe fever with thrombocytopenia syndrome in Southeastern Korea, 2015 (vol 32, pg 29, 2017) [J]. *J Korean Med Sci*, 2018, 33 (30): 29-32.
- [15] MCMULLAN L K, FOLK S M, KELLY A J, et al. A new phlebovirus associated with severe febrile illness in Missouri [J]. *New Engl J Med*, 2012, 367 (9): 834-841.
- [16] LIN T L, OU S C, MAEDA K, et al. The first discovery of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in Taiwan [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9 (1): 148-151.
- [17] TRAN X C, YUN Y, AN L V, et al. Endemic severe fever with thrombocytopenia syndrome, Vietnam [J]. *Emerg Infect Dis*, 2019, 25 (5): 1029-1031.
- [18] KANG J G, CHO Y K, JO Y S, et al. Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in dogs, South Korea [J]. *Emerg Infect Dis*, 2019, 25 (2): 376-378.
- [19] KANG J G, CHO Y K, HAN S W, et al. Molecular and serological investigation of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in cats [J]. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 2020, 20 (12): 916-920.
- [20] MATSUNO K, NONOUE N, NODA A, et al. Fatal tickborne phlebovirus infection in captive cheetahs, Japan [J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 24 (9): 1726-1729.
- [21] YAN J M, ZHANG W K, YAN L N, et al. Bunyavirus SFTSV exploits autophagic flux for viral assembly and egress [J]. *Autophagy*, 2022, 18 (7): 1599-1612.
- [22] WU X, LI Y, HUANG B, et al. A single-domain antibody inhibits SFTSV and mitigates virus-induced pathogenesis in vivo [J]. *Jci Insight*, 2020, 5 (13): e136855. DOI: 10.1172/jci.insight.136855.

- [21] WANG B H, HUANG B L, LI X Y, et al. Development of functional anti-Gn nanobodies specific for SFTSV based on next-generation sequencing and proteomics [J]. *Protein Sci*, 2022, 31 (11): e4461. DOI: 10.1002/pro.4461.
- [22] FENG Z Z, LU Y, LI J Y, et al. Preparation of human monoclonal antibody against SARS-CoV-2 spike protein using single B cell [J]. *Chin J Biologicals*, 2023, 36 (1): 48-52. (in Chinese)
冯泽众, 路阳, 李佳莹, 等. 利用单个 B 细胞制备人源 SARS-CoV-2 刺突蛋白单克隆抗体 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2023, 36 (1): 48-52.
- [23] HE X J, ZHANG S Y, JIANG J C, et al. Preparation and identification of monoclonal antibody against 43K outer membrane protein of *Fusobacterium necrophorum* [J]. *Chin J Biologicals*, 2021, 34 (1): 89-92. (in Chinese)
贺显晶, 张思瑶, 蒋剑成, 等. 牛坏死杆菌 43K OMP 单克隆抗体的制备及鉴定 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2021, 34 (1): 89-92.
- [24] SONG P X, ZHENG N, LIU Y, et al. Deficient humoral responses and disrupted B-cell immunity are associated with fatal SFTSV infection [J]. *Nat Commun*, 2018, 9 (1): 3328.
- [25] WU Y, ZHU Y H, GAO F, et al. Structures of phlebovirus glycoprotein Gn and identification of a neutralizing antibody epitope [J]. *PNAS*, 2017, 114 (36): E7564-E7573. DOI: 10.1073/pnas.1705176114.
- [26] CAO Y, SU B, GUO X, et al. Potent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 identified by high-throughput single-cell sequencing of convalescent patients' B cells [J]. *Cell*, 2020, 182 (1): 73-84 e16. DOI: 10.1073/pnas.1705176114.
- [27] SCHEID J F, BARNES C O, ERASLAN B, et al. B cell genomics behind cross-neutralization of SARS-CoV-2 variants and SARS-CoV [J]. *Cell*, 2021, 184 (12): 3205-3221.
- [28] CUI K, KONG Y R, MA C M, et al. Prokaryotic expression of enterovirus 71 type VP1 protein and its application in high-throughput antibody screening [J]. *J Shandong First Med Univ (Shandong Academy of Medical Sciences)*, 2021, 42 (9): 641-644. (in Chinese)
崔珂, 孔亚茹, 马传敏, 等. 肠道病毒 71 型 VP1 蛋白原核表达及在高通量抗体筛选中的应用 [J]. *山东第一医科大学 (山东省医学科学院) 学报*, 2021, 42 (9): 641-644.
- [29] XU M W, SONG W Q, FU Z M, et al. Progress in research on methods for preparation of monoclonal antibody at laboratory level and relevant purification strategy [J]. *Chin J Biologicals*, 2022, 35 (2): 228-232+238. (in Chinese)
徐梦蔚, 宋武琦, 付治美, 等. 实验室水平单克隆抗体制备方法及相应纯化策略的研究进展 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2022, 35 (2): 228-232+238.
- [30] SALAZAR G, ZHANG N, FU T M, et al. Antibody therapies for the prevention and treatment of viral infections [J]. *NPJ Vaccines*, 2017, 2: 19.
- [31] JU B, ZHANG Q, GE J, et al. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection [J]. *Nature*, 2020, 584 (7819): 115-119.
- [32] WANG Q, MA T, WU Y, et al. Neutralization mechanism of human monoclonal antibodies against Rift Valley fever virus [J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4 (7): 1231-1241.
- [33] KIM K H, KIM J, KO M, et al. An anti-Gn glycoprotein antibody from a convalescent patient potently inhibits the infection of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus [J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15 (2): e1007375. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007375.
- [34] ENGBAHL T B, KUZMINA N A, RONK A J, et al. Broad and potently neutralizing monoclonal antibodies isolated from human survivors of New World hantavirus infection [J]. *Cell Rep*, 2021, 36 (3): 109453. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109086.
- [35] CHEN L, DAI X X, HAO C S, et al. Development and verification of a quantitative detection assay for glycoprotein (Gn) antigen of severe fever with thrombocytopenia syndrome Bunyavirus [J]. *Chin J Biologicals*, 2017, 30 (10): 1066-1072. (in Chinese)
陈蕾, 戴新宪, 郝春生, 等. 发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒糖蛋白抗原(Gn)定量检测方法的建立及验证 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2017, 30 (10): 1066-1072.

收稿日期: 2024-04-05 编辑: 王佳凤

(上接第 13 页)

- [18] LIU X Y, AN N, ZHANG Q, et al. Construction of interferon alpha/beta receptor subunit 1 gene knockout Caco-2 cell line based on CRISPR/Cas9 system [J]. *Chin J Biologicals*, 2023, 36 (2): 145-150+157. (in Chinese)
刘欣奕, 安妮, 章青, 等. 基于 CRISPR/Cas9 系统 I 型干扰素受体亚单位 1 基因敲除的 Caco-2 细胞系的构建 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2023, 36 (2): 145-150+157.
- [19] LIU S L. Studies on the host factors involved in influenza virus replication based on the CRISPR/Cas9 system [D]. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2018. (in Chinese)
刘素丽. 基于 CRISPR/Cas9 系统研究流感病毒复制相关的宿主因子 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2018.
- [20] BAGHERI A, CULP P A, DUBRIDGE R B, et al. CRISPR/Cas9 disruption of EpCAM Exon 2 results in cell-surface expression of a truncated protein targeted by an EpCAM specific T cell engager [J]. *Biochem Biophys Res*, 2022, 29: 101205. DOI: 10.1016/j.bbrep.2022.101205.
- [21] YAU E H, KUMMETHA I R, LICHINCHI G, et al. Genome-wide CRISPR screen for essential cell growth mediators in mutant KRAS colorectal cancers [J]. *Cancer Res*, 2017, 77 (22): 6330-6339.
- [22] HART T, CHANDRASHEKHAR M, AREGGER M, et al. High-resolution CRISPR screens reveal fitness genes and genotype-specific cancer liabilities [J]. *Cell*, 2015, 163 (6): 1515-1526.
- [23] SONG L, WANG X, ZHONG P, et al. Host miR-4301 promotes rotavirus replication via PPP1R3D in Caco-2 cells [J]. *J Med Virol*, 2021, 93 (11): 6210-6219.
- [24] LIU X Y, WANG M Y, ZHANG Q, et al. The induction and suppression of type I and type III interferons by human group H rotavirus [J]. *Virology*, 2023, 581: 26-33.
- [25] LIU Y F, NA L, WANG X J. Establishment of a HeLa cell line stable expressing Cas9 protein [J]. *Chin J Prevent Veter Med*, 2020, 42 (9): 893-898. (in Chinese)
刘燕飞, 那雷, 王晓钧. 稳定表达 Cas9 蛋白的 HeLa 细胞系的建立 [J]. *中国预防兽医学报*, 2020, 42 (9): 893-898.
- [26] JOUNG J, KONERMAN S, GOOTENBERG J S, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening [J]. *Nat Protoc*, 2017, 12 (4): 828-863.
- [27] DONG W, KANTOR B. Lentiviral vectors for delivery of gene-editing systems based on CRISPR/Cas: Current state and perspectives [J]. *Viruses*, 2021, 13 (7): 1288.

收稿日期: 2024-03-18 编辑: 李靓